



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A23K 1/16, 1/18, A61K 31/739, 31/00, 38/16</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/57719</p> <p>(43) 国際公開日 2000年10月5日(05.10.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01764</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月23日(23.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/84399 1999年3月26日(26.03.99)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大鰐薬品工業株式会社 (TAIHO PHARMACEUTICAL COMPANY, LTD.)(JP/JP) 〒101-8444 東京都千代田区神田錦町1-27 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 柚頭一郎(SOMA, Genichiro)(JP/JP) 〒158-0084 東京都世田谷区東玉川1-10-21 Tokyo, (JP) 高橋幸則(TAKAHASHI, Yukinori)(JP/JP) 〒751-0856 山口県下関市神田中町5-43-304 Yamaguchi, (JP) 水野博一(MIZUNO, Denichi)(JP/JP) 〒247-0072 神奈川県鎌倉市岡本1丁目21番20号 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 田村 巖(TAMURA, Iwao) 〒561-0872 大阪府豊中市寺町1丁目9番22号 Osaka, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: ADDITIVES FOR CRUSTACEAN OR FISH FEEDS AND FEEDS</p> <p>(54) 発明の名称 甲殻類又は魚類用飼料添加剤及び飼料</p> <p>(57) Abstract Additives for crustacean or fish feeds having an immunopotentiating and infection-preventing effects, characterized by containing as the active ingredient a low-molecular weight lipopolysaccharide which is obtained from gram-negative microbial cells, has a molecular weight of 5000±2000 when measured by the SDS-PAGE method with the use of protein markers, and is substantially free from high-molecular weight lipopolysaccharides; and crustacean or fish feeds characterized by containing these additives.</p>		

(57)要約

グラム陰性の微生物菌体から得られ、タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が 5000 ± 2000 で、高分子量リボポリサッカライドを実質的に含まない、低分子量リボポリサッカライドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活、感染症予防効果を有する甲殻類又は魚類用飼料添加剤、及びこれを添加したことを特徴とする甲殻類又は魚類用飼料。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロバキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SV スウェーデン
BE ベルギー	GE ジョージア	MA モロッコ	TG トーゴ
BF ブルキナ・ファソ	GH ガナ	MC モナコ	TH タイ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TM トルクメニスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TR トルコ
BR ブラジル	GR ギリシャ	MT マルタ	TT トリニダード・トバゴ
BY ベラルーシ	HR クロアチア	NA ナミビア	TZ タンザニア
CA カナダ	HU ハンガリー	NE ニジェール	UA ウクライナ
CF 中央アフリカ	ID インドネシア	NL オランダ	UG ウガンダ
CG コンゴ	IE アイルランド	NO ノルウェー	US 米国
CH スイス	IL イスラエル	NZ ニュージーランド	UZ ウズベキスタン
CI コートジボアール	IN インド	PL ポーランド	VN ベトナム
CM カメルーン	IS アイスランド	PT ポルトガル	YU ユーゴスラヴィア
CN 中国	IT イタリア	RO ルーマニア	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本		ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア		
CZ チェコ	KG キルギスタン		
DE ドイツ	KH カンボジア		
DK デンマーク	KR 韓国		

明 細 書

甲殻類又は魚類用飼料添加剤及び飼料

5 技術分野

本発明は、甲殻類又は魚類の飼料添加剤及び該飼料添加剤を添加した飼料に係わり、特に免疫賦活、感染症予防に著効を示す飼料添加剤と、この飼料添加剤を適宜の割合で添加した飼料、並びにこれらを用いた予防方法及び飼育方法に関する。

10

背景技術

近年、甲殻類や魚類の養殖産業が発展するに伴って、細菌病並びにウィルス病が多発し、甚大な経済的被害をもたらしている。甲殻類や魚類の疾病については、クルマエビの急性ウィルス血症、ヒブリオ病、ブリの類結節症、腸球菌症、アユ
15 の冷水病、シュードモナス病、マダイ、カンパチ、ブリなどのイリドウィルス感染症などの発生が多く、経済的被害が大きい。

これらの病気のうち細菌性疾病については、治療薬として抗生物質や合成抗菌剤が用いられているが、抗菌性物質に対する耐性菌が出現し、十分な治療効果が得られていない。また、使用した薬剤の甲殻類、魚類への残留による公衆衛生上
20 の問題が生じていることから、化学療法に依存しない予防対策が強く望まれている。一方、甲殻類及び魚類のウィルス病については、ワクチンや治療薬が開発されておらず、病気が依然として多発している状況にある。

甲殻類及び魚類の免疫機能の増強と感染症の予防を目的として、ビィフィドバクテリウム・サーモフィラム由来のペプチドグリカン（特許第2547371号
25 公報）、バチラス属などグラム陽性菌の細胞壁成分（特公平3-173826号

公報)、スエヒロタケ山来の β -1,3-グルカン(特公平6-65649号公報)などの多糖類を利用することは、既に知られている。また、高分子量リボリサッカライドが魚類の免疫機能を活性化することは、既に報告されている(Salati, F. and R. Kusuda, 日本水産学会誌, 53巻, 201~204ページ, 1987年)(Odean, M. J. ら, Infection and Immunity, 58巻, 427~432ページ, 1990年)。

本発明で使用される低分子量リボリサッカライド(以下、低分子量LPSと略す)は、上記のグラム陽性菌由来のペプチドグリカン、細胞壁成分及びキノコ由来の β -1,3-グルカンと基本構造及び成分が異なり、特異な脂質リピドAとそれに共有結合したRコアと呼ばれるオリゴ糖、さらにO特異多糖の3成分よりなる物質であり、腫瘍壊死因子(TNF)産生効果増強に基づく動物用の免疫機能活性化剤として公知であるが、甲殻類及び魚類の感染症予防作用については全く知られていなかった。また、既報の研究に用いられた高分子量リボリサッカライド(LPS)は分子量が100万~1000万と、極めて大きく毒性が強いために甲殻類及び魚類に長期間投与して、常時免疫機能を活性化しておくことが不可能であった。さらに、前述の既知の物質は分子量が大きく腸管からの吸収が悪いために、多量の経口投与を必要とし、長期間投与すると免疫機能が低下するものが多かった。

既に述べた様に、甲殻類及び魚類には種々の感染症が多発し、その結果斃死に至るものもあり、甚大な経済的被害をもたらしている。この背景には、これらの甲殻類又は魚類が限られた環境で過密に飼育されることによる免疫機能の低下が挙げられる。また、低下した免疫機能を活性化する目的で、既に種々の物質が用いられているが、甲殻類は抗体を産生する能力がなく、脊椎動物にみられるリンパ球、好中球、好塩基球等が認められない等、また魚類は抗体を産生する能力が限定されており、更に変温動物であるために抗体産生が水温に大きく影響され、

このような免疫機能は充分機能していない等、両者は哺乳動物とは生体防御機構にかなりの差があること (Fish Pathology, 30 (2), 141-150, 1995, 6)、既往のLPSのように毒性が強いために養殖現場では使用できない場合があること、長期間投与するとむしろ免疫機能が低下するものが多いこと等により、甲殻類及び魚類の感染症防止に満足できるものはなかった。

本発明の目的は甲殻類及び魚類が本来的に備えている免疫機能を、ごく微量で的確に活性化して感染症を予防し、薬物残留などの公衆衛生上の問題のない、安全な甲殻類及び魚類を育成するための飼料添加剤、この飼料添加剤を添加した飼料、並びにこれらを用いた予防方法及び飼育方法を提供することにある。

10

発明の開示

本発明はグラム陰性の微生物菌体から得られ、タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が 5000 ± 2000 で、高分子量リボポリサッカライドを実質的に含まない、低分子量リボポリサッカライドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活、感染症予防効果を有する甲殻類又は魚類用飼料添加剤に係る。

15

また本発明は、上記低分子量リボポリサッカライド及び甲殻類及び魚類に許容される担体を含有する甲殻類又は魚類用飼料添加剤に係る。

また本発明は、甲殻類又は魚類用飼料添加剤を製造するための上記低分子量リボポリサッカライドの使用に係る。

20

また本発明は、上記低分子量リボポリサッカライドの有効量を甲殻類又は魚類に投与することを特徴とする甲殻類又は魚類の免疫賦活、感染症予防方法に係る。

また本発明は、上記低分子量リボポリサッカライドを有効成分として含有することを特徴とする甲殻類又は魚類の斃死予防剤に係る。

25

また本発明は、上記低分子量リボポリサッカライド及び薬学的に許容される担

体を含有する甲殻類又は魚類の斃死予防剤に係る。

また本発明は、甲殻類又は魚類の斃死予防剤を製造するための上記低分子量リボポリサッカライドの使用に係る。

5 また本発明は、上記低分子量リボポリサッカライドの有効量を甲殻類又は魚類に給餌することを特徴とする甲殻類又は魚類の斃死予防方法に係る。

また本発明は、グラム陰性の微生物菌体がバントエア属に属する微生物菌体である甲殻類又は魚類用飼料添加剤に係る。

また本発明は、グラム陰性の微生物菌体がバントエア・アグロメランスである甲殻類又は魚類用飼料添加剤に係る。

10 また本発明は、上記飼料添加剤又は斃死予防剤を添加したことを特徴とする甲殻類又は魚類用飼料に係る。

また本発明は上記飼料を甲殻類又は魚類に与えることを特徴とする甲殻類又は魚類の飼育方法に係る。

本発明は、グラム陰性の微生物菌体から例えば特開平8-198902号公報
15 において開示された方法によって精製した物質で、分子量が 5000 ± 2000 の低分子量LPSを飼料に添加して、甲殻類及び魚類に投与したところ、甲殻類・魚類が本来的に備えている免疫機能が活性化され、ウィルスや細菌による感染症が防御され、斃死が予防され、しかも安全性が非常に高いことを確認して、本発明を完成した。

20 本発明の低分子量LPSは、前記したようにグラム陰性の微生物菌体から、例えば特開平8-198902号公報において開示された方法によって得られた分子量为 5000 ± 2000 のリボポリサッカライドを言うが、その特徴は従来の高分子量LPS（分子量100万～1000万）に比べて甲殻類及び魚類に対する安全性が高く、顕著な免疫活性化作用及び感染症予防効果並びに斃死予防効果
25 を有することにある。

本発明において、実質的に高分子量リポポリサッカライドを含まないとは 8 0 0 0 以上の分子量のものを含まないことを意味する。

本発明において、グラム陰性の微生物菌体としては例えばバントエア属、サルモネラ属、アエロモナス属、セラチア属、エンテロバクロー属等に属する微生物菌体、その他特開平 4-99481 号公報に記載のグラム陰性の微生物菌体などを挙げるができる。好ましい微生物はバントエア属に属する微生物であり、より好ましくはバントエア・アグロメランズ (Pantoea agglomerans) である。

この発明の低分子量 LPS は、グラム陰性の微生物等を、常法により培養し、培地から菌体を集め、集めた菌体から公知の方法、例えば、熱フェノール法 [オー・ウエストファール (O. Westphal) 編、メソッズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー (Methods in Carbohydrate Chemistry)、第 5 巻、第 8 3 ページ、アカデミック・プレス (Academic Press)、1965 年]、により抽出し、さらに、陰イオン交換樹脂により精製して製造できる。すなわち、微生物の菌体を蒸留水に懸濁し、この懸濁液を蒸留水および等容量の熱フェノールの混合液に添加して攪拌し、次いで遠心分離して水層を回収し、この水層を透析してフェノールを除去し、限外濾過法により濃縮して粗 LPS 画分を採取し、この画分を常法の陰イオン交換クロマトグラフィー (例えば、モノ Q-セファロースまたは Q-セファロースを使用する) により精製し、常法により脱塩する。

このようにして得られた精製 LPS は特開平 4-187640 号公報、特開平 4-49240 号公報、特開平 4-99481 号公報および特開平 5-155778 号公報に開示される分子量 5,000 から 6,000 程度の LPS と実質的に等しい。さらに、得られた精製、LPS を、例えばデオキシコール酸ナトリウム等の界面活性剤の存在下でゲル濾過し、低分子量 LPS を含有する画分のみを回収し、混在する高分子量 LPS を除去することによって、高度に精製された本発明の低分子量 LPS を得ることができる。この界面活性剤存在下でのゲル濾過の

工程は、特開平4-187640号公報、特開平4-49240号公報および特開平5-155778号公報に開示される分子量5,000から6,000程度のLPSを更に高度に精製するためのものであり、この工程により混在する高分子量LPSが完全に排除されるのである。

- 5 本発明の対象となる甲殻類とは、クルマエビ (*Penaeus japonicus*)、ウシエビ (*Penaeus monodon*)、コウライエビ (*Penaeus chinensis*)、バナナエビ (*Penaeus merguensis*) 等のクルマエビ類を含む全てのエビ類 (lobster, shrimp, prawn を含む)、上海ガニ、ガザミ等の全てのカニ類を含み、好ましくはエビ類であり、更に好ましくはクルマエビ類である。魚類とは、ブリ、フグ、
- 10 マダイ、ヒラメ、ウナギ、ニジマス等の、全ての魚類を含む。感染症とは甲殻類の急性ウイルス血症、ビブリオ病、*Bpistylis* sp., *Zoothamnium* sp. 等の寄生症、あるいは *Lagenidium* sp., *Siropidium* sp. 等の真菌症、魚類のイリドウイルス感染症、ラブドウイルス病、神経壊死症、伝染性造血器壊死症、類結節症、連鎖球菌症、腸球菌症、ビブリオ病、冷水病、シュードモナス病、滑走細菌
- 15 症、水カビ病のほか、全てのウイルス、マイコプラズマ、細菌、真菌及び寄生虫に起因する感染症を言い、好ましくは、甲殻類の急性ウイルス血症、魚類の連鎖球菌症、腸球菌症、ビブリオ症である。

- 本発明においては、低分子量LPSを、そのまま、あるいは公知の担体、安定剤等を加えて、更に必要に応じてビタミン、アミノ酸類、ミネラル等の各種養分、
- 20 抗酸化剤、抗生物質、抗菌剤及びその他の添加剤等を加えて、甲殻類又は魚類用の飼料添加剤となしてもよく、その形状としては、粉体、顆粒、ペレット、懸濁液等の適宜の状態に調製すればよい。本発明の飼料添加剤を給餌する場合は、甲殻類又は魚類に対し、単独で給餌しても良いし、飼料に混合して給餌しても良い。給餌時期は、疾患予防のために常時給餌しても、また飼養後半に添加してもよい。
- 25 また、本発明の飼料は特に限定されるものではなく、粉末飼料、固型飼料、モ

イストベレット飼料、ドライベレット飼料、EP (Extruder Pellet) 飼料、生餌など、どのような飼料でもよい。

本発明において低分子量LPSの飼料添加剤又は飼料等への配合量は広い範囲から選択できるが、好ましくは飼料添加剤又は飼料に対して0.000001～0.0001重量%、特に好ましくは0.00002～0.00005重量%であるが、これに限定されるものではない。低分子量LPSの給餌量は適宜決定すれば良いが、例えば甲殻類及び魚類の体重1kgあたり1H量として1～100μg、好ましくは10～20μgを投与するのがよいが、これに限定されるものではない。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明について説明するが、これら実施例に何ら限定されるものではない。尚、実施例に用いられた低分子量LPSとは分子量約5,000のLPSであり、高分子量LPSとは分子量8,000～5万のLPSである。

参考例1 (低分子量LPSの製造)

トリプトン (ディフコ社製) 10g、酵母エキス (ディフコ社製) 5g、NaCl (和光純薬工業社製、特級) 10gを蒸留水1リットルに添加し、NaOHでpHを7.5に調整し、オートクレーブで滅菌し、別に滅菌したグルコース (和光純薬工業社製、特級) を0.1%の割合で添加した培地 (以下L-肉汁培地と記載する) 100mlの入った500ml容の坂口フラスコに、-80℃で保存されているバントエア・アグロメランス (Pantoea agglomerans) 保存菌株から単一コロニーを分離して接種し、35℃で1夜振とう培養し、そのまま全量を1,000mlのL-肉汁培地の入った3リットル容の坂口フラスコに接種し、同様に培養した。

さらに、7リットルのL-肉汁培地の入った10リットル容の卓上型ファーマンター（丸菱バイオエンジニアリング社製）に培養した菌体を接種し、同条件で通気培養し、のち集菌し、約70gの湿菌体を回収し、これを凍結保存した。凍結保存菌体約++70gを500mlの蒸留水に懸濁し、500mlの90%熱フェノールを
5 添加して65~70℃で20分間攪拌し、冷却し、10,000G、4℃で20分間遠心処理し、水層を回収した。フェノール層を更に1回前記と同一の操作を反復し、回収した2回の水層を合し、1夜透析してフェノールを除去し、透析内液を限外濾過装置（アドヴァンテック・トーヨー社製、UK-200）を用いて分子量20万カッターオフ膜により2気圧の窒素ガス下で限外濾過濃縮した。

- 10 得られた粗LPS凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、フィルター滅菌し、緩衝液を添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー（ファルマシア社製、Q-セファロース・ファースト・フロー）にかけ、10mMトリス-HCl（pH7.5）および10mMのNaClを含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200~400mM NaCl/10mMトリス-HCl（pH7.5）でリムラス活性画分を溶出させ
15 た。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩および濃縮し、凍結乾燥し、約70gの湿菌体から約300mgの精製LPSを得た。

- 得られた精製LPS100mgを5mg/mlの濃度で可溶化緩衝液〔3%デオキシコール酸ナトリウム（和光純薬社製）0.2M塩化ナトリウム、5mMEDTA-2Naおよび20mMトリス-塩酸からなり、pH8.3〕に溶解し、
20 精製LPS溶液20mlをセファクリルS-200HRカラム（ファルマシア社製）の上部に静かに重層し、溶出緩衝液〔0.25%デオキシコール酸ナトリウム（和光純薬社製）、0.2M塩化ナトリウム、5mMEDTAおよび10mMトリス-塩酸からなり、pH8.3〕により流速16ml/時で800ml（50時間）溶出した。
25 ベリスタポンプPI（ファルマシア社製）を用いて流速を制御しながら、得ら

れた溶出液を、フラクションコレクター（アドバンテック社製、SF2120）により分画し、最初の240ml（24フラクション分）を廃棄し、その後10ml/フラクションで80フラクションまで分画した。溶出した各画分について原液または希釈液でフェノール/硫酸法（福井作蔵、「還元糖の定量法・第2

- 5 版」、第50～52ページ、学会出版センター、1990年）により糖の定量を行い、溶出状態を調べた。得られた溶出状態の結果から、LPSの存在が予想される分画（フラクション30～60）のうち、フラクション37～55の各フラクション0.5mlを用いてSDS-PAGEを行い、LPSの分画パターンを調べた。

- 10 その結果、フラクション45～55は低分子量（分子量約5,000）LPSのみが認められ、フラクション37～44は高分子量および低分子量の両方のLPSが認められたので、フラクション45～55の低分子量LPS分画を次のとおりさらに精製した。

- 各画分を混合して凍結乾燥し、エタノールに懸濁し、遠心分離によりエタノールに可溶なデオキシコール酸を除去し、低分子量LPSを不溶性画分に回収した。15 低分子量LPS画分のエタノール処理をさらに2回反復し、デオキシコール酸を除去し、次に70%エタノールに再度懸濁し、遠心分離で緩衝液成分を除去し、この操作をさらに3回反復し、低分子量LPSを不溶性画分に回収し、凍結乾燥し、精製した低分子量LPSを約20mg得た。

- 20 実施例1 （甲殻類に対する低分子量LPSの安全性）

- 平均体重20gのクルマエビを20尾ずつの5群に分け、本発明の低分子量LPS（分子量約5,000）をエビの体重1kgあたり1区には50mg、2区には100mgを、また従来的高分子量LPS（大腸菌由来LPS、E. coli 0111, DIFCO社製、分子量約8,000～5万）を3区には10mg、425 区には20mgとなるように第3腹節筋肉内に投与した。5区にはLPSを含ま

ない生理食塩水を投与した。投与後 120 時間までのエビの生死を確認し、斃死率を求めた。結果を表 1 に示した。

【表 1】

試 験 区 分	斃死尾数／供試尾数	斃死率 (%)
1 区低分子量 LPS 50 mg / kg	0 / 20	0
2 区低分子量 LPS 100 mg / kg	0 / 20	0
3 区高分子量 LPS 10 mg / kg	13 / 20	65
4 区高分子量 LPS 20 mg / kg	20 / 20	100
5 区生理食塩水区	0 / 20	0

- 5 表 1 から明らかなように、高分子量 LPS の 10 mg 及び 20 mg 区の斃死率がそれぞれ 65、100 % であったのに対して、低分子量 LPS の 50 mg 区及び 100 mg 区は、いずれも斃死する個体が全くみられなかった。このことから、本発明の低分子量 LPS は従来の高分子量 LPS に比べて、エビに対する安全性が極めて高い物質であることが明らかである。

10 実施例 2 (魚類に対する低分子量 LPS の安全性)

平均体重 85 g のマゴイを 40 尾ずつ 3 群に分け、マゴイの体重 1 kg 当たり、1 区には低分子量 LPS 100 mg を、2 区には高分子量 LPS (E. coli 0111, DIFCO 社製) 20 mg を、いずれも背部筋肉内に投与した。3 区には LPS を含まない生理食塩水を投与した。投与後 120 時間までのマゴイの生死を確認し、斃死率を求めた。結果を表 2 に示した。

【表 2】

試 験 区 分	斃死尾数／供試尾数	斃死率 (%)
1 区低分子量 LPS 100 mg / kg	0 / 40	0
2 区高分子量 LPS 20 mg / kg	34 / 40	85
3 区生理食塩水区	0 / 40	0

- 表 2 から明らかなように、高分子量 LPS 20 mg 区の斃死率が 85 % であったのに対して、低分子量 LPS 100 mg 区は斃死する個体が全くみられなかった。このことから、本発明の低分子量 LPS は従来の高分子量 LPS に比べて、

魚類に対する安全性が極めて高い物質であることが明らかである。

実施例3 (甲殻類における血球の食食能に対する活性化作用)

平均体重20gのクルマエビを20尾ずつの6群に分け、本発明区の1、2、3区には低分子量LPSをエビの体重1kg当たり1日量として、それぞれ20、40、100μgを、また高分子量LPSを4区には100μg、5区には1000μgとなるように飼料に混合して7日間投与した。6区にはLPSを含まない飼料を与えた。投与開始0、1、5、7日後に、抗凝固剤としてのヘパリンを含むK-199培地を入れた注射器を用いてエビの胸洞から採血し、遠心分離によって血球を得た。懸濁液1μl当たり 1×10^5 細胞の血球と 1×10

8個のラテックスビーズ(直径1.986μm)を混合し、25℃で30分間反応させたのち、グルタルアルデヒドで固定後、風乾した。風乾後、ギムザ液で染色し、オイキットを用いてスライドガラス上に固定した。この標本をエビ1尾当たり5枚作製し、落射蛍光顕微鏡を用いて標本1枚当たり200個の血球を無作為に観察し、血球のラテックスビーズ食食率、血球1細胞当たりのビーズ取り込み数を調べ、下式によって食食指数を求めた。

食食率 = [ビーズを取り込んだ血球数 / 観察した血球の総数] $\times 100$

平均取り込み数 = 血球に取り込まれたビーズ数 / ビーズを取り込んだ血球数

食食指数 = [ビーズを取り込んだ血球数 / 観察した血球の総数] \times [血球に取り込まれたビーズ数 / 観察した血球の総数] $\times 100$

試験結果：甲殻類の生体防御機構は、細胞性因子と液性因子によって構成されており、前者には異物に対する血球の食食能が深く関与していることから、エビの生体防御能が活性化しているか否かは、異物に対する血球の食食活性を調べることによって明らかになる[高橋幸則ら：魚病研究30(2)、141~150

(1995)]。そこで、本発明の低分子量LPS区及び高分子量LPS区にお

ける投与開始0、1、5、7日後の食食指数を調べ、表3に示した。

【表3】

試験区分	血球の食食指数	
	0	1 (日後)
1区低分子量LPS20 μ g/kg	0.9 \pm 0.18	2.1 \pm 0.61 ※2
2区低分子量LPS40 μ g/kg	0.9 \pm 0.18	3.3 \pm 1.16 ※2
3区低分子量LPS100 μ g/kg	0.9 \pm 0.18	3.8 \pm 1.00 ※2
4区高分子量LPS100 μ g/kg	0.9 \pm 0.18	0.7 \pm 0.31
5区高分子量LPS1000 μ g/kg	0.9 \pm 0.18	1.1 \pm 0.63
6区LPS無添加料区	0.9 \pm 0.18	0.5 \pm 0.24

試験区分	血球の食食指数	
	5	7 (日後)
1区低分子量LPS20 μ g/kg	3.2 \pm 0.71 ※2	8.4 \pm 1.37 ※2
2区低分子量LPS40 μ g/kg	4.5 \pm 0.75 ※2	3.7 \pm 1.02 ※2
3区低分子量LPS100 μ g/kg	3.1 \pm 0.94 ※2	2.8 \pm 0.70 ※1
4区高分子量LPS100 μ g/kg	0.7 \pm 0.82	1.2 \pm 0.44
5区高分子量LPS1000 μ g/kg	2.1 \pm 0.58 ※1	2.9 \pm 0.68 ※1
6区LPS無添加料区	0.7 \pm 0.5	1.1 \pm 0.56

※1：6区との間に有意差 ($P < 0.05$)

※2：6区との間に有意差 ($P < 0.01$)

- 5 表3から明らかなように、低分子量LPSを投与したエビにおける血球の食食指数は、いずれの本発明区とともに6区に比べて高く、有意な差が見られた ($P < 0.01$, 0.05)。しかし、従来的高分子量LPSを100 μ g投与したエビにおける血球の食食指数は投与1、5、7日後ともに上昇せず、1000 μ g区においては投与5、7日後に6区よりも有意に高くなった ($P < 0.05$)。以上
- 10 のことから、本発明の低分子量LPSは高分子量LPSよりも極めて微量で、エビ血球の食食活性などの生体防御能を活性化することが明らかである。

実施例4 (甲殻類における血球のフェノールオキシダーゼに対する活性化作用)

- 平均体重20gのクルマエビを20尾ずつの6群に分け、本発明区の1、2、
- 15 3区には低分子量LPSをエビの体重1kg当たり1日量として、それぞれ20、

40、100 μg を、また高分子量LPSを4区には100 μg 、5区には1000 μg となるように飼料に混合して7日間投与した。6区にはLPSを含まない飼料を与えた。投与開始0、1、5、7日後に、EDTAを含むKHE培地を入れた注射器を用いてエビの胸洞から採血し、遠心分離によって血球を得た。得

- 5 られた血球をCa-Mg Hepes培地に 1×10^6 細胞/mlとなるように懸濁し、のち、凍結融解と超音波によって破壊し、遠心分離によって得られた上清をメンブレンフィルターでろ過した。この液900 μl と基質溶液としてのL-DOPA溶液100 μl を混合後、60℃温度下で60分間反応させ、分光光度計を用いて490 nmにおける吸光度を測定し、フェノールオキシダーゼ(PO)活性とした。

試験結果：甲殻類の生体防御機構は、細胞性因子と液性因子によって構成されており、後者には血球のPO活性が深く関与していることから、エビの生体防御能が活性化しているか否かは、PO活性を調べることによって明らかになる。そこで、本発明の低分子量LPS区及び高分子量LPS区における投与開始0、1、

- 15 5、7日後のPO活性を調べ、表4に示した。

【表4】

試験区分	PO活性 (吸光度・490nm)			
	0	1	5	7 (日後)
1区低分子量 LPS20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.092	0.105	0.199 ※1	0.405 ※2
2区低分子量 LPS40 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.092	0.115	0.201 ※1	0.325 ※2
3区低分子量 LPS100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.092	0.166 ※1	0.170 ※1	0.292 ※2
4区高分子量 LPS100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.092	0.093	0.124	0.138
5区高分子量 LPS1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.092	0.104	0.197 ※1	0.230 ※1
6区LPS無添加対照区	0.092	0.093	0.136	0.123

※1：6区との間に有意差 ($P < 0.05$)

※ 2 : 6 区との間に有意差 ($P < 0.01$)

表 4 から明らかなように、低分子量 LPS を投与したエビにおける血球の PO 活性は、いずれの本発明区ともに 6 区に比べて高く、有意な差がみられた ($P < 0.01$, 0.05)。しかし、従来的高分子量 LPS を $100 \mu\text{g}$ 投与したエビ 5 における血球の PO 活性は投与 7 日後まで上昇せず、 $1000 \mu\text{g}$ 区においては投与 5、7 日後に 6 区よりも有意に高くなった ($P < 0.05$)。以上のことから、本発明の低分子量 LPS は高分子量 LPS よりも極めて微量で、エビ血球の PO 活性などの生体防御能を活性化することが明らかである。

実施例 5 (クルマエビ急性ウィルス血症に対する予防効果)

- 10 平均体重 14 g のクルマエビを 20 尾ずつの 5 群に分け、本発明区の 1、2、3 区には低分子量 LPS をエビの体重 1 kg 当たり 1 日量として、それぞれ 20 、 40 、 $100 \mu\text{g}$ を、また 4 区には高分子量 LPS を $1000 \mu\text{g}$ となるように飼料に混合して 18 日間投与した。5 区には特許第 2547371 号公報記載の
- 15 ビィフィドバクテリウム・サーモフィラム由来のペプチドグリカン (PG) を 0.2 mg/kg ($200 \mu\text{g/kg}$) となるように、6 区には特公平 6-65649 号公報記載のスエヒロタケ由来の $\beta-1,3$ -グルカン ($1,3\text{-G}$) を 50 mg/kg ($50000 \mu\text{g/kg}$) となるように飼料に混合して 18 日間投与した。7 区の対照区には、LPS を含まない飼料を与えた。

- LPS を投与開始 8 日後に、クルマエビ急性ウィルス血症の原因ウィルスである PRDV (penaeid rod-shaped DNA virus) を用いて感染試験を行った。
- 20 感染方法は、本病によって斃死した 3 尾のクルマエビの頭胸部甲皮を剥がしたのち、 40 ml の滅菌海水中でホモジナイズし、遠心分離 ($10,000 \times g$ 、10 分間、 4°C) によって得られた上清 10 ml を 20 リットルの海水に加えた。この中に LPS を投与開始 8 日後のエビを 2 時間浸漬する方法によって感染させ
- 25 た。感染後 10 日間の斃死状況を観察し、斃死したエビについては病理学的及び

PCR (Polymerase chain reaction) 法による検査を行ってPRDVによる斃死であることを確認した。

試験結果：本発明の低分子量LPS区、高分子量LPS区及びLPS無添加区のPRDV感染後におけるクルマエビの累積斃死尾数と斃死率を表5～6に示した。

5 【表5】

試験区分	感染後の経過日数				
	1	2	3	4	5
1区低分子量 LPS 20 μ g/kg	0	0	0	2※	3
2区低分子量 LPS 40 μ g/kg	0	0	3	4	4
3区低分子量 LPS 100 μ g/kg	1	1	3	3	4
4区高分子量 LPS 1000 μ g/kg	1	1	6	6	6
5区PG 0.2mg/kg	0	0	2	5	5
6区1,3-G 50mg/kg	0	3	5	7	10
7区LPS無添加区	2	4	13	14	15

※数字は累積斃死尾数を示す（他も同じ）

【表6】

試験区分	感染後の経過日数					斃死率 (%)
	6	7	8	9	10	
1区低分子量 LPS 20 μ g/kg	3	3	4	4	4	20※※※
2区低分子量 LPS 40 μ g/kg	6	6	6	7	7	35※※※
3区低分子量 LPS 100 μ g/kg	5	6	8	8	8	40※※※
4区高分子量 LPS 1000 μ g/kg	9	9	10	11	11	55※※
5区PG 0.2mg/kg	7	8	8	8	10	50※※
6区1,3-G 50mg/kg	10	11	11	12	12	60※※
7区LPS無添加区	18	18	19	20	20	100

※※ 7区との間に有意差 ($P < 0.05$)

※※※ 7区との間に有意差 ($P < 0.01$)

PRDVによる感染後に、LPS無添加飼料を与えた対照区のエビは9日以内に100%が斃死したのに対し、本発明区の斃死率は低分子量LPS 20 μ g区が20%、40 μ g区が35%、100 μ g区が40%といずれも低く、対照区との間に有意な差がみられた ($P < 0.01$)。一方、高分子量LPSを1000 μ g投与したエビの斃死率は55%、PGを0.2mg投与したエビの斃死率は50%、1.3-Gを50mg投与したエビの斃死率は60%であり、低分子量LPSを投与した各区に比べて多数のエビが斃死した。以上の結果から、本発明の低分子量LPSはエビのウィルスによる感染を防御し、その効果は従来の高分子量LPSよりもすぐれていることが明らかである。

実施例6 (魚類の免疫機能に対する活性化作用)

平均体重230gのブリを20尾ずつの6群に分け、本発明の1、2、3区には低分子量LPSをブリの体重1kg当たり1日量として、それぞれ20、40、100 μ gを、また高分子量LPSを4区には100 μ g、5区には1000 μ gとなるようにモイストレットに混合して7日間投与した。6区にはLPSを含まないモイストレットを与えた。投与開始0、1、5、7日後に5尾ずつのブリから頭腎を摘出し、0.25%NaCl添加RPMI-1640-HAH培地を入れたプラスチックシャーレ内で血球細胞を分離し、細胞ろ過器に通して細胞懸濁液を得た。この液をpercoll不連続密度勾配上に重層したのち、1600rpm、20分間(4℃)の遠心分離を行って白血球層を得た。

この層を採取後、遠心洗浄して10%FBS (Fetal Bovine Serum) を含む0.25%NaCl添加RPMI-1640-HA培地に懸濁し、白血球の細胞数を 1×10^6 細胞/mlに調整した。この白血球懸濁液500 μ lと、ブリ血清でオプソニン化しておいた酵母の懸濁液(1×10^8 細胞/ml) 500 μ lをシリコン処理したガラス試験管に入れ、10分おきに攪拌しながら25℃で6

0 分間インキュベートした。インキュベート終了後、プリ 1 個体当たり 5 枚の塗抹標本を作製し、ライト染色を施してオイキットで封入した。さらに、光学顕微鏡によって 1 標本あたり 200 細胞の血球を無作為に観察し、白血球の酵母食食数を調べ、実施例 3 と同様の計算式によって食食指数を求めた。結果を表 7 ~ 8

5 に示した。

【表 7】

試験区分	白血球の食食指数	
	0	1 (日後)
1 区低分子量 LPS 20 μ g/kg	7.3 \pm 2.30	12.7 \pm 2.65 ※1
2 区低分子量 LPS 40 μ g/kg	7.3 \pm 2.30	17.9 \pm 3.99 ※2
3 区低分子量 LPS 100 μ g/kg	7.3 \pm 2.30	18.6 \pm 4.12 ※2
4 区高分子量 LPS 100 μ g/kg	7.3 \pm 2.30	6.3 \pm 2.24
5 区高分子量 LPS 1000 μ g/kg	7.3 \pm 2.30	8.2 \pm 2.18
6 区 LPS 無添加飼料区	7.3 \pm 2.30	6.6 \pm 1.19

※1 : 6 区との間に有意差 ($P < 0.05$)

※2 : 6 区との間に有意差 ($P < 0.01$)

10 【表 8】

	白血球の食食指数	
	5	7 (日後)
1 区低分子量 LPS 20 μ g/kg	39.2 \pm 2.54 ※2	52.7 \pm 4.08 ※2
2 区低分子量 LPS 40 μ g/kg	37.4 \pm 4.28 ※2	37.0 \pm 3.11 ※2
3 区低分子量 LPS 100 μ g/kg	42.6 \pm 5.35 ※2	36.5 \pm 4.32 ※1
4 区低分子量 LPS 100 μ g/kg	11.2 \pm 3.05	10.6 \pm 2.96
5 区低分子量 LPS 1000 μ g/kg	22.7 \pm 3.16 ※1	31.8 \pm 3.52 ※1
6 区 LPS 無添加飼料区	9.0 \pm 2.04	7.7 \pm 1.73

※1 : 6 区との間に有意差 ($P < 0.05$)

※ 2 : 6 区との間に有意差 ($P < 0.01$)

表 7 ~ 8 から明らかなように、低分子量 LPS を投与したブリにおける白血球の食食指数は、いずれの発明区ともに 6 区に比べて高く、有意な差がみられた

($P < 0.01$, 0.05)。しかし、従来の高分子量 LPS を $100 \mu\text{g}$ 投与し

- 5 たブリにおける白血球の食食指数は、投与 7 日後まで上昇せず、 $1000 \mu\text{g}$ 区においては投与 5 日後以降に 6 区よりも有意に高くなった ($P < 0.01$)。以上のことから、本発明の低分子量 LPS は高分子量 LPS よりも極めて微量で、白血球の食食作用などの魚類の免疫機能を活性化することが明らかである。

実施例 7 (ブリの腸球菌症に対する予防効果)

- 10 平均体重 63 g のブリを 30 尾ずつの 5 群に分け、本発明の 1、2、3 区には低分子量 LPS をエビの体重 1 kg 当たり 1 日量として、それぞれ 20、40、 $100 \mu\text{g}$ を、また 4 区には高分子量 LPS を $1000 \mu\text{g}$ となるようにモイストベレットに混合して、毎日投与した。5 区の対照区には、LPS を含まないモイストベレットを与えた。投与開始 7 日後にブリの腸球菌症の原因菌 *Enterococcus*
- 15 *seriolicida* をブリ 1 尾当たり 4.0×10^6 細胞となるように腹腔内接種し、接種後 15 日間の斃死率を求めた。結果を表 9 ~ 10 に示した。

【表 9】

試験区分	感染後の経過日数								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1区低分子量 LPS $20 \mu\text{g}/\text{kg}$	0	0	0	0	0	0	0	0	1※
2区低分子量 LPS $40 \mu\text{g}/\text{kg}$	0	0	0	1	1	2	2	4	4
3区低分子量 LPS $100 \mu\text{g}/\text{kg}$	0	0	0	0	0	1	3	3	5
4区高分子量 LPS $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$	0	0	0	1	1	1	3	3	3
5区LPS無添加区	0	0	1	2	7	7	10	12	16

※ 数字は累積斃死尾数を示す (他も同じ)

【表10】

試験区分	感染後の経過日数						死亡率 (%)
	10	11	12	13	14	15	
1区低分子量 LPS20 μ g/kg	3	3	3	3	4	4	13.3***
2区低分子量 LPS40 μ g/kg	7	8	8	8	8	8	26.7**
3区低分子量 LPS100 μ g/kg	5	5	5	7	7	7	23.3**
4区高分子量 LPS1000 μ g/kg	5	9	10	10	11	11	36.7**
5区LPS無添加区	16	16	17	22	22	22	73.3

※※5区との間に有意差 ($P < 0.05$)

※※※5区との間に有意差 ($P < 0.01$)

- 5 E. Seriolicidaを接種して15日後に、LPS無添加飼料を与えた対照区のブリの73.3%が斃死したのに対し、本発明区の斃死率は低分子量LPS20 μ g区が13.3%、40 μ g区が26.7%、100 μ g区が23.3%といずれも低く、対照区との間に有意な差が見られた ($P < 0.05$)。一方、高分子量LPSを1000 μ g投与したブリの斃死率は36.7%であり、低分子量LPSの各区に比べて高い斃死率を示した。以上の結果から、本発明の低分子量LPSは魚類の細菌による感染を防御し、その効果は従来的高分子量LPSよりもすぐれていることが明らかになった。
- 10

産業上の利用可能性

- 15 本発明によれば、甲殻類及び魚類の免疫機能を、ごく微量で的確に活性化して感染症を予防し、また、甲殻類及び魚類の斃死を予防し、薬物残留などの公衆衛生上の問題のない、安全な甲殻類及び魚類を育成するための飼料添加剤及び飼料を提供することができる。

請求の範囲

1. グラム陰性の微生物菌体から得られ、タンパク質マーカーを用いて SDS-PAGE 法で測定した分子量が 5000 ± 2000 で、高分子量リボポリ
5 サッカライドを実質的に含まない、低分子量リボポリサッカライドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活、感染症予防効果を有する甲殻類又は魚類用飼料添加剤。

2. 請求の範囲第 1 項の低分子量リボポリサッカライド及び甲殻類又は魚類に許容される担体を含有する甲殻類又は魚類用飼料添加剤。

10 3. 甲殻類又は魚類用飼料添加剤を製造するための請求の範囲第 1 項の低分子量リボポリサッカライドの使用。

4. 請求の範囲第 1 項の低分子量リボポリサッカライドの有効量を甲殻類又は魚類に投与することを特徴とする甲殻類又は魚類の免疫賦活、感染症予防方法。

15 5. 請求の範囲第 1 項の低分子量リボポリサッカライドを有効成分として含有することを特徴とする甲殻類又は魚類の斃死予防剤。

6. 請求の範囲第 1 項の低分子量リボポリサッカライド及び薬学的に許容される担体を含有する甲殻類又は魚類の斃死予防剤。

20 7. 甲殻類又は魚類の斃死予防剤を製造するための請求の範囲第 1 項の低分子量リボポリサッカライドの使用。

8. 請求の範囲第 1 項の低分子量リボポリサッカライドの有効量を甲殻類又は魚類に投与することを特徴とする甲殻類又は魚類の斃死予防方法。

9. グラム陰性の微生物菌体がバントエア属に属する微生物菌体である請求の範囲第 1 項の甲殻類又は魚類用飼料添加剤。

25 10. グラム陰性の微生物菌体がバントエア・アグロメランスである請求

の範囲第9項の甲殻類又は魚類用飼料添加剤。

1 1. 請求の範囲第1項の飼料添加剤を添加したことを特徴とする甲殻類又は魚類用飼料。

5 1 2. 請求の範囲第5項の斃死予防剤を添加したことを特徴とする甲殻類又は魚類用飼料。

1 3. 請求の範囲第11項の飼料を甲殻類又は魚類に与えることを特徴とする甲殻類又は魚類の飼育方法。

1 4. 請求の範囲第12項の飼料を甲殻類又は魚類に与えることを特徴とする甲殻類又は魚類の飼育方法。

10 1 5. 感染症が甲殻類の急性ウィルス血症、ピブリオ病、寄生虫、真菌症、魚類のイリドウィルス感染症、ラウドウィルス病、神経壊死症、伝染性造血器壊死症、類結節症、連鎖球菌症、腸球菌症、ピブリオ病、冷水病、シュードモナス病、滑走細菌症、水カビ病である請求の範囲第1項の甲殻類又は魚類用飼料添加剤。

15 1 6. 高分子量リボポリサッカライドが8000以上の分子量を有するものである請求の範囲第1項の甲殻類又は魚類用飼料添加剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A23K 1/16, 1/18, A61K 31/739, 31/00, 38/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A23K 1/16, 1/18, A61K 31/739, 31/00, 38/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS, JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 9623002, A1 (Mizuno D.), 01 August, 1996 (01.08.96) & JP, 8-198902, A	1-16
X Y	JP, 6-141849, A (Soma Genichiro), 24 May, 1994 (24.05.94) (Family: none)	1-8, 11-16 9, 10
X Y	EP, 472467, A3 (Soma G.), 17 March, 1993 (17.03.93) & CA, 2049533, A & CA, 2049548, A & JP, 4-99481, A & JP, 6-78756, A & US, 5281583, A & JP, 6-40973, A & JP, 6-90745, A & US, 5346891, A & US, 5494819, A	1-8, 11-16 9, 10
A	JP, 8-280332, A (National Federation of Agriculture Coop. Assoc.), 29 October, 1996 (29.10.96) (Family: none)	1-16
A	JP, 10-279486, A (Taiyo Kagaku Co., Ltd.), 20 October, 1998 (20.10.98) (Family: none)	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 May, 2000 (16.05.00)

Date of mailing of the international search report
23 May, 2000 (23.05.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01764

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 592220, A3 (Eisai Co., Ltd.), 23 November, 1994 (23.11.94) & JP, 6-116157, A & JP, 6-327412, A & JP, 7-41427, A & JP, 6-116158, A & US, 5556624, A & US, 5556625, A & US, 5624671, A & US, 5628998, A	1-16
A	Yukinori Takahashi, <i>Youshoku</i> , Vol.34, No.10, pp.117-121 (1997)	1-16
A	Fulvio Salati et al., <i>Nippon Suisan Gakkaishi</i> , vol.53 (2), pp.201-204 (1987)	1-16
A	Marilyn J. Odean et al., <i>Infection and Immunity</i> , vol.58 (2), pp.427-432 (1990)	1-16
A	L.W.Clem et al., <i>Development and Comparative Immunology</i> , vol.9, p.803-809 (1985)	1-16

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/01764

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A23K 1/16, 1/18, A61K 31/739, 31/00, 38/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A23K 1/16, 1/18, A61K 31/739, 31/00, 38/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Biosis, Jois

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 9623002, A1 (Mizuno D.) 1. 8月. 1996 (01. 08. 96) & JP, 8-198902, A	1-16
X Y	JP, 6-141849, A (杉源一郎) 24. 5月. 1994 (24. 05. 94) ファミリーなし	1-8, 11-16 9, 10
X Y	EP, 472467, A3 (Soma G.) 17. 3月. 1993 (17. 03. 93) & CA, 2049533, A & CA, 2049548, A & JP, 4-99481, A & JP, 6-78756, A & US, 5281583, A & JP, 6-40973, A & JP, 6-90745, A & US, 5346891, A & US, 5494819, A	1-8, 11-16 9, 10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 05. 00

国際調査報告の発送日

23.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 8-280332, A (全国農業協同組合連合会) 29. 10. 1996 (29. 10. 96) ファミーなし	1-16
A	JP, 10-279486, A (太陽化学株式会社) 20. 10. 1998 (20. 10. 98) ファミーなし	1-16
A	EP, 592220, A3 (Eisai Co. Ltd.) 23. 11. 1994 (23. 11. 94) & JP, 6-116157, A & JP, 6-327412, A & JP, 7-41427, A & JP, 6-116158, A & US, 5556624, A & US, 5556625, A & US, 5624671, A & US, 5628998, A	1-16
A	高橋幸則, 養殖, 第34巻第10号, 第117-121頁 (1997)	1-16
A	Fulvio Salati et al., Nippon Suisan Gakkaishi, vol. 53 (2), p. 201-204 (1987)	1-16
A	Marilyn J. Odean et al., Infection and Immunity, vol. 58 (2), p. 427-432 (1990)	1-16
A	L. W. Clem et al., Development and Comparative Immunology, vol. 1. 9, p. 803-809 (1985)	1-16